

研究課題別評価

1 研究課題名:がん抑制遺伝子 *RB1CC1* の機能解明とがん克服への挑戦

2 研究者氏名:茶野 徳宏

3 研究のねらい:

RB1CC1 (RB1-inducible Coiled-Coil 1) は全く新しいがん抑制遺伝子で、網膜芽細胞腫遺伝子 (RB1) の発現を調節することによって細胞のがん化を抑えている。しかし、RB1CC1 の働きの機序など不明な点は多く、本研究では、将来的な新規治療、創薬を見据え、RB1CC1 と介在する、もしくは標的となる分子を明らかにする。そして、ここより得る知見をがん克服への新たな切り口として応用する。

4 研究成果:

RB1CC1 と介在する分子を明らかにする目的で、共免疫沈降→蛋白質質量分析、yeast two hybrid、これら方法を用いて解析を進めた。この結果、RB1CC1 結合分子として TSC1, GADD34, hSNF5, Smad7 等を同定した。

RB1CC1 は TSC1 と結合することによって、TSC1 の ubiquitin 化を促進し、この分解を促すことを明らかにした。TSC1 の分解は TSC1/2 complex の mTOR への抑制作用を解除し、mTOR-S6K 経路を活性化する。このことは、蛋白質合成レベルの維持、そして細胞サイズの維持をもたらすこともわかった。RB1CC1 のこの作用は、本来 RB1CC1 発現レベルの高い神経、筋の細胞、組織において、細胞生物学的にも特に重要であることが明らかとなった。RB1CC1 の高発現は RB1 経路の増強を促し、細胞増殖を抑制するが、元々 RB1CC1 発現レベルの高い神経、筋では RB1 経路、mTOR 経路、両者が強く維持されている。このことは、神経細胞及び筋細胞が細胞増殖をきたさず、より大きな細胞サイズであり続けることに積極的に関わっており、これら神経、筋組織における細胞、組織の構築維持に重要であることが明らかとなった(投稿中)。ヒト疾患との関連においては Alzheimer 病を代表とする神経変性疾患の病態に関与することもわかってきている。

RB1CC1-TSC 経路の解析をきっかけに、RB1CC1 結合分子の一つである GADD34 の新しい機能も明らかになった。発現誘導によってがん抑制作用のある分子として以前よりクローニングされていた GADD34 は、通常細胞においては各種ストレス時にも発現誘導されてくるが、この時 RB1CC1 同様、GADD34 も mTOR 経路に機能することが明らかとなった。GADD34 は mTOR 経路に対して negative な働きを示し、一時的な蛋白質合成の抑止を促す。ストレス時における蛋白質合成の過剰亢進は細胞に apoptosis をもたらしてしまうが、細胞はストレス時に GADD34 を誘導発現し、mTOR 経路をストレス回避時まで抑制することによって蛋白質合成を抑止し、apoptosis を回避していることが明らかとなった(投稿中)。Rapamycin を代表とする mTOR 経路の抑制剤は結節性硬化症を代表とする種々の疾患の治療に応用されてきているが、GADD34 はこの経路に作用し、蛋白質合成、細胞死をコントロールする新規創薬の分子モデルとなりうる可能性を示唆された。

RB1CC1 は核内クロマチンリモデリングファクターの一つである hSNF5/INI1 とも複合体を形成することが明らかとなったが、RB1CC1-hSNF5 complex は p53 とも更に複合体を形成し、これを安定化させることによって、p21 発現亢進をきたすことが解ってきた。つまり、p53→p21→RB1 の経路において、p53 による p21 の転写過程に RB1CC1-hSNF5 complex が貢献し、これを安定化、持続させる。このことにより、RB1 経路は増強され、細胞増殖は抑制される。更に、RB1CC1-hSNF5 の強発現は p21 発現亢進による細胞老化を通して、がん化抑制に貢献していることも明らかとなっている(投稿準備中)。

RB1CC1 は TGF- β 経路の negative regulator である Smad7 とも結合するが、この結合は Smad7 の分解を促し、TGF- β シグナルを増強することが分かった。増強された TGF- β シグナルは、抗腫瘍活性を示すが、Smad7 分解の様式と合わせ、この詳細については現在も解析中であり、今後更なる解明の待たれるところである。

5 自己評価:

これまで、RB1CC1 結合分子を同定することを発端として、RB1CC1 の経路、機能の一部についてその詳細を明らかにすることができた。

特に TSC-mTOR 経路との関わりについては、これまで不明であった神経、筋組織における RB1CC1 高発現の意義を説明するものであった。この解明は、研究開始当初に提唱していた RB1CC1 機能と神経、筋疾患との関与をさらに論拠づけるものと考えられた。RB1CC1 機能の更なる解明が、がんのみならず、現在治療法の存在しない、神経、筋疾患の理解、そして新たな治療法の創出にも繋がるものであると期待された。また、この経路の解明より副次的に明らかとなった GADD34-mTOR 経路の詳細は、あらたな細胞ストレスに対応する経路の解明であるばかりか、新規創薬分子モデルとしての GADD34 の可能性も示唆している。

RB1CC1-hSNF5 の解明は、当初に提唱した RB1 経路、がん増殖抑制経路の解明に直接繋がるもので、未だ論分準備段階ではあるが、がんという疾患の理解、克服への新たな切り口としては一定の評価ができると考えているが、未だ data としては不十分な部分がある。TGF- β →Smad 経路と RB1CC1 との関わりについては今後の課題であり、更なる解明が待たれる。

一方で、当初より提案していた RB1CC1 knockout mouse の作成は未だ完成していない。これまで既に targeting vector を作り替えながら約 4,000-5,000 個の ES clones を解析したが、未だ遺伝子相同組換え ES 細胞が cloning できず、現在も version5 の targeting vector (conditional knock-out) を用いて、組換え ES 細胞をスクリーニング中である。あきらめることなく、作成を試みているが、非常に難航しているのが実情で、当初の提案通りの期間内では一定の見解も得られなかった。反省点ではあるが、今後の研究課題として残っている。しかしながら、RB1CC1 発現異常モデル動物の作成に関しては、CAG-loxP-neo-loxP-RB1CC1 導入による conditional overexpression の transgenic mouse を作成し、現在4系統のマウスラインを樹立できたので、この解析を進めている。今後その結果の期待される場所である。

6 研究総括の見解:

RB1CC1に結合する蛋白質を免疫沈降やyeast two hybrid法などを利用して明らかにした成果は評価できる。しかし、研究の方向が見つけた蛋白質次第で散乱してゆくため、がん、神経、筋組織等々散漫になった感がする。ノックアウト動物作成の成功がこの研究の意義を明らかにすると考えられる。今後は、徹底的に蛋白質相互作用の関係を広げることに意義を見いだすのか、本来の目的であるがんへの取り組みに集中するのか、どちらがサイエンスにまた社会に貢献できるかを考える時期に来ていると考える。

7 主な論文等:

論文

1. Watanabe R, Chano T, Inoue H, Isono T, Koizumi O, Okabe H. Rb1cc1 is critical for myoblast differentiation through Rb1 regulation. *Virchows Arch.* 2005; 447(3): 643-8.
2. Tsuchiya T, Osanai T, Ogoe A, Tamura G, Chano T, Kaneko Y, Ishikawa A, Orui H, Wada T, Ikeda T, Namba M, Takigawa M, Kawashima H, Hotta T, Tsuchiya A, Ogino T, Motoyama T. Methylation status of EXT1 and EXT2 promoters and two mutations of EXT2 in chondrosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005; 158(2): 148-55.
3. Bamba N, Chano T, Taga T, Ohta S, Takeuchi Y, Okabe H. Expression and regulation of RB1CC1 in developing murine and human tissues. *Int J Mol Med.* 2004; 14(4): 583-7.
4. Mori K, Kizawa H, Ushiyama T, Chano T, Inoue H, Tsuchiya N, Okabe H, Matsusue Y, Ikegawa S. Association of CYP17 with HLA-B27-negative seronegative spondyloarthritis in Japanese males. *Am J Med Genet A.* 2004; 130(2): 169-71.
5. Mori K, Chano T, Matsumoto K, Ishizawa M, Matsusue Y, Okabe H. Type-selective muscular degeneration promotes infiltrative growth of intramuscular lipoma. *BMC Musculoskelet Disord.* 2004; 5:20. Review.
6. Mori K, Chano T, Yamamoto K, Matsusue Y, Okabe H. Expression of macrophage inflammatory

- protein-1alpha in Schwann cell tumors. *Neuropathology* 2004; 24(2): 131-5.
7. Chano T, Mori K, Scotlandi K, Benini S, Lapucci C, Manara MC, Serra M, Picci P, Okabe H, Baldini N. Differentially expressed genes in multidrug resistant variants of U-2 OS human osteosarcoma cells. *Oncol Rep.* 2004; 11(6): 1257-63.
 8. Serra M, Reverter-Branchat G, Maurici D, Benini S, Shen JN, Chano T, Hattinger CM, Manara MC, Pasello M, Scotlandi K, Picci P. Analysis of dihydrofolate reductase and reduced folate carrier gene status in relation to methotrexate resistance in osteosarcoma cells. *Ann Oncol.* 2004; 15(1): 151-60.
 9. Teramoto K, Chano T, Ozaki Y, et al. Expression of *RB1CC1*, a novel tumor suppressor gene, is inversely correlated with the Ki-67 proliferation index in primary breast cancers. *Cancer Therapy* 1: 103-107. 2003.
 10. Kontani K, Chano T, Ozaki Y, Tezuka N, Sawai S, Fujino S, Saeki Y, Okabe H. RB1CC1 suppresses cell cycle progression through RB1 expression in human neoplastic cells. *Int J Mol Med.* 2003; 12(5): 767-9.
 11. Ushiyama T, Chano T, Inoue K, Matsusue Y. Cytokine production in the infrapatellar fat pad: another source of cytokines in knee synovial fluids. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62(2): 108-12.
 12. Mori K, Chano T, Ikeda T, Ikegawa S, Matsusue Y, Okabe H, Saeki Y. Decrease in serum nucleotide pyrophosphatase activity in ankylosing spondylitis. *Rheumatology.* 2003; 42(1): 62-5.
 13. Ozaki Y, Kontani K, Hanaoka J, Chano T, Teramoto K, Tezuka N, Sawai S, Fujino S, Yoshiki T, Okabe H, Ohkubo I. Expression and immunogenicity of a tumor-associated antigen, 90K/Mac-2 binding protein, in lung carcinoma. *Cancer.* 2002; 95(9): 1954-62.

特許

- ・ 特許出願P2003-132095「細胞・組織の機能評価方法」

受賞、招待講演

なし